西方蜜蜂六个亚种苹果酸脱氢酶Ⅱ基因的遗传差异

刘艳荷[1]，陈盛禄[1*]，童富淡[2]，张传溪[1]

（1. 浙江大学应用昆虫研究所，杭州 310029；2. 浙江大学生物化学研究所，杭州 310029）

摘要：研究了西方蜜蜂 *Apis mellifera* 6 亚种——浙农大 1 号意蜂（ZND-*A. m. ligustica*）、东北黑蜂（*A. m.* ssp.）、卡尼鄂拉蜂（*A. m. carnica*）、喀尔巴阡蜂（*A. m. carpatica*）、高加索蜂（*A. m. caucasica*）和乌克兰蜂（*A. m. acervorum*）苹果酸脱氢酶Ⅱ的基因型频率、基因频率和杂合纯合度。浙农大 1 号意蜂、喀尔巴阡蜂和高加索蜂的纯合度较高，但浙农大 1 号意蜂等位基因 c 频率最高，喀尔巴阡蜂等位基因 b 频率最高，高加索蜂等位基因 a 频率最高；东北黑蜂、卡尼鄂拉蜂和乌克兰蜂是高度杂合的亚种，但东北黑蜂等位基因 a、b、c 的频率差异较小，卡尼鄂拉蜂和乌克兰蜂主要存在 a、c 两个等位基因，b 出现频率很小；6 亚种的基因型频率、基因频率和杂合纯合度都有极显著差异。这些差异将从遗传和生化角度为西方蜜蜂 6 个亚种的鉴别提供依据。

关键词：西方蜜蜂；苹果酸脱氢酶；基因；遗传差异

中图分类号：Q963 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）02-0188-05

Genetic variability of MDH Ⅱ gene in six subspecies of *Apis mellifera*

LIU Yan-He[1]，CHEN Sheng-Lu[1*]，TONG Fu-Dan[2]，ZHANG Chuan-Xi（1. Institute of Applied Entomology，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China；2. Institute of Biochemical Research，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China）

Abstract：The malate dehydrogenase（MDH）isozyme in six subspecies of *Apis mellifera*，i.e.，"Zhejiang Agricultural University" No.1 *A. m. ligustica*（Ea），*A. m.* ssp.（Db），*A. m. carnica*（Cn），*A. m. carpatica*（Cp），*A. m. caucasica*（Cc），and *A. m. acervorum*（Ac），was studied with isoelectrofocusing polyacrylamide gel electrophoresis（IEF-PAGE），and their genotype frequency，allele frequency，homozygous and heterozygous degree were analyzed. Ea，Cp and Cc showed high homozygous degree，but the allele with the highest frequency was c in Ea；b in Cp；and a in Cc. Db，Cn and Ac are highly heterozygous subspecies，but the frequency differences of the allele a，b and c in Db were less than the others；and the frequencies of the allele a，c were higher，while the allele b was rare in Cn and Ac. There were highly significant differences in the genotype frequency，the allele frequency and the heterozygous and homozygous degree among six subspecies. These differences provided some genetic clues for the discrimination of six subspecies.

Key words：*Apis mellifera*；malate dehydrogenase（MDH）；gene；genetic variability

同工酶（isozyme）是一组功能相同结构各异的酶，它是由染色体上不同基因位点或同一位点的等位基因编码，已被广泛用于自然种群特别是昆虫学的研究。Contel 等测定了西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 22 种同工酶，其中 4 种是多态性的，即由等位基因编码的等位基因酶（allozyme），包括苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase，MDH）、酯酶（esterase，EST）、醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase，ADH）、苹果酸酶（malic enzyme，ME）（Contel *et al.*，1977；Sheppard，1984）。EST 在种以上分类单元差异显著，但在种内各亚种之间没有差异，是种系鉴定的一组重要酶。李绍文等（1986）检测了蜜蜂属 *Apis* 的 EST，证明该属存在 6 个种。MDH 是糖代谢中一个重要的酶，在线粒体上，催化苹果酸氧化成草酰乙酸；在细胞质中，又将草酰乙酸还原成苹果酸。在西方蜜蜂中，MDH 在 pH 2～10 区间内，存在 3 类

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39470552）和浙江省科委重点项目（971102012）

第一作者简介：刘艳荷，女，1965 年出生，博士生，研究方向为蚕蜂种质资源和遗传育种

* 通讯作者 Author for correspondence，现工作单位：浙江大学动物科学学院；E-mail：susongkun@163.net

收稿日期 Received：2000-10-20；接受日期 Accepted：2001-03-28

同工酶（MDHⅠ、MDHⅡ、MDH Ⅲ），MDHⅠ位于pH 5.1~5.6范围内，MDHⅡ在pH 6.7~7.5范围内，MDH Ⅲ在pH 9.6左右，不同等级和不同发育阶段蜜蜂的MDHⅠ和MDH Ⅲ变化不大。MDHⅡ呈多态现象，由3个等位基因（a、b、c）编码，这3个等位基因编码的酶带分别位于pH 6.7、pH 7.2和pH 7.5。就由受精卵发育而来的二倍体雌性蜂（蜂王、工蜂）而言，具有6种基因型（aa、bb、cc、ab、bc、ac）。在酶谱上，MDHⅡ是二聚体酶，纯合子为1条带，杂合子为3条带（Cornuet，1979；Rozalski *et al*.，1996；李举怀等，1990）。这种酶遗传稳定且无组织和发育龄期的特异性，因此对蜜蜂的种内鉴定、遗传变异及亲缘关系的确立很有价值。

浙农大1号意蜂 *Apis mellifera ligustica*（下略为Ea）、卡尼鄂拉蜂 *A. m. carnica*（下略为Cn）、高加索蜂 *A. m. caucasica*（下略为Cc）、卡尔巴阡蜂 *A. m. carpatica*（下略为Cp）、东北黑蜂 *A. m.* ssp.（下略为Db）、乌克兰蜂 *A. m. acervorum*（下略为Ac）是我国养蜂业应用的主要亚种。本试验采用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳（isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis，IEF-PAGE）的方法，通过对MDHⅡ基因型频率、基因频率和杂合纯合度的分析，确定它们之间的遗传差异，为蜜蜂育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试西方蜜蜂亚种：Ea种王来自浙江大学实验蜂场；Cp、Cn、Db种王来自吉林省养蜂科学研究所种蜂场；Cc、Ac种王来自牡丹江小蜜蜂集团公司种蜂场，引入浙江大学实验蜂场蜂群。

取样时间为1999年3月蜜蜂春繁后。取羽化后3日龄内试飞前的工蜂，剪下头部，放入-20℃冰箱中保存、备用。

1.1.2 主要仪器和试剂：LKB2197型电泳仪，LKB2117型电泳槽，LKB2219冷却水循环仪；安福林（Ampholin）pH 6~8、辅酶Ⅰ（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD）、氯化硝基四氮唑兰（nitroblue tetrazolium，NBT）、硫酸吩嗪二甲酯（phenazine methosulfate，PMS）、苹果酸（malic acid）。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备：将冰冻工蜂头部置于0.5 mL的Eppendorf管中，加入0.05 mL提取液（0.05 mol / L Tris-HCl缓冲液，pH 6.5~7.0，含0.25% Triton X-100）。研磨后，在4~10℃，12 000 r/min条件下离心2 min，取上清液点样。

1.2.2 电泳：丙烯酰胺浓度为5.5%，交联度为4.8%（何忠效等，1999）。采用IEF-PAGE检测MDHⅡ同工酶型和基因型。

每个亚种测定90头工蜂个体，每个样品为1头个体。

1.3 数据统计与分析方法

参照MDHⅡ的6种基因型图谱（Rozalski *et al*.，1996；Nunamaker *et al*.，1981），确定电泳图谱的基因型，然后统计3项指标。采用χ^2分析的独立性检验方法进行检验，并对基因型频率、基因频率、杂合纯合度进行分析。

2 结果

2.1 基因型频率、基因频率、杂合纯合度及独立性检验结果

6个亚种中，Ea出现ac、bc、cc 3种基因型，纯合子cc基因型频率最高，为63.4%；Db出现ab、ac、bc、cc 4种基因型，它们的频率分别为19.8%、25.0%、26.0%和29.2%，比较接近；Cp出现aa、ab、ac、bb、bc 5种基因型，bb基因型频率居多，为41.3%；Cc出现aa、ab、ac、bc 4种基因型，aa基因型频率较高，为54.8%。Cn出现aa、ab、ac、cc 4种基因型，Ac出现aa、ab、ac、bc、cc 5种基因型，两者均以杂合子ac基因型频率占绝对优势，分别为73.1%和79.2%（表1、表2）。

a、b、c 3个等位基因频率，Ea中c占绝对优势，为81.7%；Cp中b占绝对优势，为61.4%；Cc是a占绝对优势，为70.4%。Db是等位基因c居多，为54.7%。Cn和Ac中主要含有a、c两个等位基因，Cn的a为40.9%、c为58.1%；Ac的a为47.9%、c为46.9%。等位基因b出现很少，Cn的只有1.1%、Ac的为5.2%。

Ea、Cp、Cc的纯合度较高，分别为63.4%、43.5%和45.2%；而Db、Cn、Ac的杂合度较高，分别为70.8%、75.3%和89.6%（表2）。

独立性检验结果，6个亚种的MDHⅡ基因型频率、基因频率和杂合纯合度均存在极显著差异，即$\chi^2 > \chi^2_{0.01}$。两两配对进行检验，基因型频率除Cn×

Ac 组合差异显著（$\chi^2 > \chi^2_{0.05}$）外，其余均达到极显著水平；基因频率除 Cn×Ac 组合差异不显著外，其余均达到极显著水平。杂合纯合度 Ea×Cc、Db×Cp、Db×Cn、Cp×Cc 组合差异不显著，Cn×Ac 差异显著，其余均达到极显著水平（表3）。

表1 西方蜜蜂6个亚种 MDHⅡ基因型数量

Table 1 Number of MDHⅡ genotypes in six subspecies of *A. mellifera*

亚种 Subspecies	测定数目 Number	基因型数目 Number of MDHⅡ genotypes					
		aa	ab	ac	bb	bc	cc
Ea	112	0	0	31	0	10	71
Db	96	0	19	24	0	25	28
Cp	92	2	31	15	38	6	0
Cn	93	3	2	68	0	0	20
Cc	93	51	7	22	0	13	0
Ac	96	4	8	76	0	2	6

Ea. 浙农大1号意蜂 *Apis mellifera ligustica*；Db. 东北黑蜂 *A. m.* spp.；Cp. 喀尔巴阡蜂 *A. m. carpatica*；Cn. 卡尼鄂拉蜂 *A. m. carnica*；Cc. 高加索蜂 *A. m. caucasica*；Ac. 乌克兰蜂 *A. m. acervorum*。下同 The same for the following tables

表2 西方蜜蜂不同亚种 MDHⅡ基因型频率、基因频率、杂合纯合度

Table 2 The genotype frequency, allele frequency, homozygous and heterozygous degree of MDHⅡ in six subspecies of *A. mellifera*

亚种 Subspecies	基因型频率（%） Genotype frequency						基因频率（%） Allele frequency			杂合度（%） Heterozygous degree	纯合度（%） Homozygous degree
	aa	ab	ac	bb	bc	cc	a	b	c		
Ea	0.0	0.0	27.7	0.0	8.9	63.4	13.8	4.5	81.7	36.6	63.4
Db	0.0	19.8	25.0	0.0	26.0	29.2	22.4	22.9	54.7	70.8	29.2
Cp	2.2	33.7	16.3	41.3	6.5	0.0	27.2	61.4	11.4	56.5	43.5
Cn	3.2	2.2	73.1	0.0	0.0	21.5	40.9	1.1	58.1	75.3	24.7
Cc	54.8	7.5	23.7	0.0	14.0	0.0	70.4	10.8	18.8	54.8	45.2
Ac	4.2	8.3	79.2	0.0	2.1	6.3	47.9	5.2	46.9	89.6	10.4

2.2 6个亚种之间的遗传差异

基因型 aa 在 Ea 和 Db 中均未出现，Cp、Cn、Ac 中出现机率很小，最高仅为4.2%，但在 Cc 中频率很高；基因型 bb 在 Ea、Db、Cn、Cc、Ac 5个亚种中均没有出现，只在 Cp 中出现，且频率很高；基因型 cc 的频率在 Cp 和 Cc 中为零，Db 和 Cn 中较高，为29.17%和21.51%，而在 Ea 中最高。杂合子 ab 在 Ea 中未出现，bc 在 Cn 中未出现。等位基因 a 的频率在 Cc 中最高，Cn 和 Ac 中次之，然后是 Db 和 Cp，Ea 最少；等位基因 b 的频率是 Cp 中最高，Db 和 Cc 较少，而 Ea、Cn、Ac 中很少；等位基因 c 的 频率是 Ea 最高，然后是 Db、Cn、Ac，Cp 中最少。Ea、Cp、Cc 的纯合度较高，而 Db、Cn、Ac 是高度杂合的亚种。6个亚种在这3项指标上的差异，可从遗传和生化角度为它们的鉴别提供一个依据。

3 讨论

3.1 自然界中基因型频率和基因频率变化的原因

根据 Hardy-Weinberg 定律，在一个无限大的随机交配的群体里，基因型频率和基因频率在没有迁移、突变和选择的条件下，世代相传不会发生变化。但实际上这些条件是无法满足的，因此自然界中基因型频率和基因频率不断发生变化，使物种得到进化。首先，在现实中没有无限大的群体，有些群体甚至很小。当从一个大群体中的小样本建立起一个新的隔离群体时，它只带有亲代群体的一部分遗传多样性。再加上两个隔离群体占据区域不同，所受的选择压力不同，进化途径便产生分歧，使这

表3 MDHⅡ基因型、基因和杂合纯合度的统计分析结果

Table 3 The result of significance test for genotype frequency, allele frequency, heterozygous and homozygous degree of MDHⅡ in six subspecies of *A*. *mellifera*

亚种 Subspecies（成对比较）(Paired comparison)	基因型 Genotype		基因 Allele		杂合纯合度 Heterozygous and homozygous degree	
	df	χ^2	*df*	χ^2	*df*	χ^2
Ea/Db	5	40.95**	2	19.80**	1	22.19**
Ea/Cp	5	143.88**	2	106.60**	1	7.19**
Ea/Cn	5	55.45**	2	19.42**	1	28.76**
Ea/Cc	5	127.19**	2	79.94**	1	1.18
Ea/Ac	5	88.46**	2	28.29**	1	58.00**
Db/Cp	5	89.79**	2	46.34**	1	3.83
Db/Cn	5	68.21**	2	25.39**	1	0.30
Db/Cc	5	93.19**	2	46.75**	1	12.49**
Db/Ac	5	72.26**	2	21.01**	1	9.92**
Cp/Cn	5	133.41**	2	92.34**	1	7.00**
Cp/Cc	5	110.64**	2	56.55**	1	2.15
Cp/Ac	5	107.19**	2	74.73**	1	26.10**
Cn/Cc	5	109.63**	2	35.81**	1	17.67**
Cn/Ac	5	14.67*	2	4.46	1	6.12*
Cc/Ac	5	88.58**	2	18.20**	1	42.87**
279.32**	25	781.04**	10		5	84.03**

*，** 分别达 0.05 和 0.01 显著水平；*，** Significance at the $P = 0.05$ and $P = 0.01$ level, respectively

两个隔离群体间差异增大，形成各自不同的基因库。第二，在自然群体中，个体间的交配一般也是有选择的。而人们为了实现某一经济目标，要进行特定品种杂交或回交，使基因型频率、基因频率发生变化。第三，在自然群体中，突变经常发生，它是改变群体中基因型频率和基因频率的因素之一。第四，当群体中有另一群体的个体迁入，而迁移者的基因频率与原栖居的群体不同，或者迁移者携带了新的基因，都可以使该群体的基因频率发生改变。自然选择通过差别生存保存有利于繁衍、生存的基因或基因组合，使其频率不断增加，淘汰那些不利于繁衍、生存的基因或基因组合，不同的环境选择出不同的优势基因，从而定向地改变群体的基因频率。以上5种改变基因频率的过程自然界中普遍存在，在地理或生殖隔离的情况下，一个物种可能会逐渐分化出不同的亚种、品系或地理宗。所以，基因型频率、基因频率的差异反映了种群间的遗传差异，这种差异可用于种内亚种或品系的鉴别。

3.2 6个亚种的起源及亲缘关系

据报道，西方蜜蜂各亚种在 MDHⅡ位点上3个等位基因频率分布不同，非洲蜜蜂 *Apis mellifera scutellata* 和非洲化蜜蜂（Africanized honeybees）中等位基因 a 的出现频率最高（Nunamaker *et al*., 1984；Badino *et al*., 1989）；西方蜜蜂指名亚种 *A*. *m*. *mellifera* 中 b 出现频率最高，意蜂 *A*. *m*. *ligustica* 中 c 占有优势比例（Sheppard *et al*., 1985）。由于蜂王的商业出口，导致了各种群中都含有不同比例的 a、b、c。因此3个等位基因 a、b、c 出现频率的不同，在一定程度上反映着不同蜜蜂种群血统组成和遗传渊源的差异。

本试验研究了西方蜜蜂的6个亚种，共580头个体。由结果可以看出，浙农大1号意蜂属于意蜂型蜂，卡尔巴阡蜂属于西方蜜蜂指名亚种型蜂，高加索蜂属于非洲蜜蜂型蜂。东北黑蜂是19世纪末20世纪初，由俄罗斯引入黑龙江与吉林省山区，经自然选择和人工培育而成的一个优良品种。有些报道认为它是中俄罗斯蜂（西方蜜蜂指名亚种的一个品系）和卡尼鄂拉蜂的过渡类型，并在一定程度上混有高加索蜂和意蜂血统，这与实验结果基本一

致。有作者认为，喀尔巴阡蜂是卡尼鄂拉蜂的一个品系（Ruttner，1986；刘先蜀，1998）。但它们 MDH Ⅱ的基因型频率、基因频率都相差甚远，杂合纯合度差异极显著。可能原因如下：西方蜜蜂指名亚种和卡尼鄂拉蜂最初被阿尔卑斯山严格隔开，西方蜜蜂指名亚种在北部，卡尼鄂拉蜂在东南部。但在俄罗斯，没有这样的天然屏障，因此表现出从北部类型向南部类型缓慢的变化。而蜜蜂引种，只引进几个种王，由于遗传漂变、人为干预、迁移、突变及自然选择等原因，使其向各自的方向进化，形成基因型频率、基因频率的明显差异。卡尼鄂拉蜂、乌克兰蜂亲缘关系较近，基因频率没有差异，但基因型频率存在显著差异，杂合纯合度之间存在极显著差异，因此卡尼鄂拉蜂和乌克兰蜂是两个完全不同的亚种。再者卡尼鄂拉蜂的 cc 基因型频率、c 的基因频率显著高于乌克兰蜂，而 a、b 的基因频率低于乌克兰蜂，可能这些差异决定了两者的行为特性和生产性能的不同。

参 考 文 献 （References）

Badino G，Celibrano G，Manino A，1989. Population structure and Mdh-1 locus variation in *Apis mellifera lingustica*. *J. Hered.*，74：443－446.

Contel E，Mesteriner M A，Martins E，1977. Genetics control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochem. Genet.*，15：859－876.

Cornuet J M，1979. The MDH system in honeybees of Guadeloupe. *J. Hered.*，70：223－224.

He Z X，Zhang S Z，1999. Electrophoresis. 2nd ed. Beijing：Science and Technology Press. 59-104.［何忠效，张树政，1999. 电泳. 第二版. 北京：科学出版社. 59－104］

Li J H，Li S W，1990. Electromorph and genetype of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Acta Scientiarum Naturalirm Universitatis Pekinensis*，26（2）：237－242.［李举怀，李绍文，1990. 意蜂苹果酸脱氢酶同工酶的电泳表型和基因型. 北京大学学报（自然科学版），26（2）：237－242］

Li S W，Meng Y P，Zhang Z B，Li J H，He S Y，Kuang B Y，1986. Comparative study of esterase isozymes in six of *Apis*. *Acta Scientiarum Naturalirm Universitatis Pekinensis*，24（4）：53－57.［李绍文，孟玉萍，张宗炳，李举怀，和绍禹，匡帮郁，1986. 蜜蜂属（*Apis*）六个种酯酶同工酶的研究. 北京大学学报（自然科学版），24（4）：53－57］

Liu X S，1998. Honeybee varieties. In：Zhang F X ed. Modern Apicultural Production. China Agricultural University Press. 161－162.［刘先蜀，1998. 蜜蜂的品种. 见张复兴主编，现代养蜂生产. 北京：中国农业大学出版社. 161－162］

Nunamaker R A，Wilson W T，1981. Comparison of MDH Ⅱ allozyme patterns in the African honeybee（*Apis mellifera adansonii* L.）and the Africanized population of Brazil. *J. Kansas Entomol. Soc.*，54：707－710.

Nunamaker R A，Wilson W T，1984. Electrophoretic detection of Africanized honeybees（*Apis mellifera scutellata*）in Guatemala and Mexico based on malate dehydrogenase allozyme patterns. *J. Kansas Entomol. Soc.*，57（4）：622－631.

Rozalski R J，Sakurai H，Tsuchida k，1996. Esterase and malate dehydrogenase isozyme analysis in the population of honeybees，*Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Jap. J. Entomol.*，64：910－917.

Ruttner F，1986. Geographical variability and classification. In：Rinderer T E ed. Bee Genetics and Breeding. London：Academic Press Inc. 49－50.

Sheppard T P，Berlocher S H，1984. Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. *J. Apic. Res.*，23：64－69.

Sheppard T P，Berlocher S H，1985. New allozyme variability in Italian honeybees. *J. Hered.*，70（1）：45－48.